

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-101899

(P2002-101899A)

(43)公開日 平成14年4月9日(2002.4.9)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト(参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 5 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09	Z N A	G 0 1 N 21/78	C 4 B 0 2 9
G 0 1 N 21/78		33/53	M 4 B 0 6 3
33/53		33/566	

審査請求 有 請求項の数21 O L (全 24 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-300577(P2000-300577)

(22)出願日 平成12年9月28日(2000.9.28)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成11年度新エネルギー・産業技術総合開発機構(再)委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 神原 秀記

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 周 国 華

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74)代理人 100068504

弁理士 小川 勝男 (外2名)

最終頁に続く

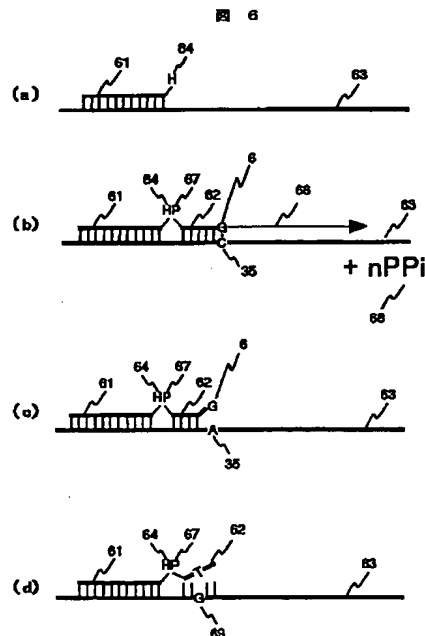
(54)【発明の名称】 DNA変異検出方法及びDNA変異検出装置

(57)【要約】

【課題】 ゲル電気泳動を用いないDNA変異検出方法、及び装置を提供する。

【解決手段】 相補鎖伸長能力のある5塩基長から8塩基長の範囲の短いオリゴマー6と、ターゲットDNAにハイブリダイズし、相補鎖伸長能力のない長いオリゴマー61とを直列にターゲットDNA 63にハイブリダイズさせる工程と、4種類の核酸基質とポリメラーゼとを用いて、短いプライマーを起点とする相補鎖伸長反応66を行なう工程と、相補鎖伸長反応の反応副産物として生じるピロリン酸68をATPに変換し、酵素を用いて発光反応を行ない発光を検出する工程とを有し、特定の配列の有無を検出する。

【効果】 DNA変異計測に要求される種々の項目を容易に知ることができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ターゲットDNAの期待される変異を含む特定の配列の領域に相補的な配列を含むプライマーをハイブリダイズさせ、核酸基質とポリメラーゼとを用いて、前記プライマーを始点とする相補鎖伸長反応が進行するか否かを、前記相補鎖伸長反応の進行の反応副産物として生じるピロリン酸を利用した化学発光を検出することにより前記特定の配列の有無を検出することを特徴とするDNA変異検出方法。

【請求項2】請求項1記載のDNA変異検出方法において、複数種の前記核酸基質、あるいはこれらの類似体を同時に加えて、前記相補鎖伸長反応を繰り返すことを特徴とするDNA変異検出方法。

【請求項3】請求項1記載のDNA変異検出方法において、相補鎖伸長可能な4種の核酸基質、あるいはこれらの類似体を同時に加えることを特徴とするDNA変異検出方法。

【請求項4】請求項1から請求項3の何れか記載のDNA変異検出方法において、前記プライマーの末端塩基が変異部の塩基とマッチするか否かで相補鎖合成の伸張あるいは非伸張を行うが、更に、その3'末端の近傍に、前記ターゲットDNAと相補的でないヌクレオチドをひとつ持つものとしプライマー3'末端のマッチ、ミスマッチにより相補鎖伸張をより確実に制御する形として、1塩基置換(SNPs)を検出することを特徴とするDNA変異検出方法。

【請求項5】請求項1から請求項4の何れか記載のDNA変異検出方法において、前記相補鎖伸長反応による伸長相補鎖を末端から酵素で分解し、前記プライマーを前記ターゲットDNAに繰り返しハイブリダイズさせて、前記相補鎖伸長反応を行なわせ、伸長反応に応じて生成されるピロリン酸を検出することを特徴とするDNA変異検出方法。

【請求項6】請求項5記載のDNA変異検出方法において、前記伸長相補鎖を分解する酵素は、5'末端からDNA鎖を分解する酵素であることを特徴とするDNA変異検出方法。

【請求項7】ターゲットDNAに相補であり、目的とする1塩基置換部位、又はその近傍に3'末端がハイブリダイズするDNAプライマーを用いて、前記プライマーを始点とする少なくとも複数の核酸基質を連続的に取り込むべく設計された相補鎖伸長反応により生じるピロリン酸を利用して化学発光を起こさせて、発光を検出することにより、1塩基置換(SNPs)を検出することを特徴とする1塩基置換検出方法。

【請求項8】請求項1から請求項7の何れかに記載の方法に使用する試薬キットであり、前記ターゲットDNAに相補であり、目的とする1塩基置換部位、又はその近傍に3'末端がハイブリダイズするべく設計されたDNAプライマーと、核酸基質とを少なくとも含むことを特

徴とする試薬キット。

【請求項9】請求項1から請求項7の何れかに記載の方法に使用する試薬キットであり、前記ターゲットDNAに相補であり、目的とする塩基置換部位、又はその近傍に3'末端がハイブリダイズするべく設計されたDNAプライマーと、核酸基質と、不純物として含まれるピロリン酸を分解する酵素とを含み、1塩基置換(SNPs)の検出に使用されることを特徴とする試薬キット。

【請求項10】末端ヌクレオチドの種類がそれぞれワイルドタイプおよびミュータントDNAサンプルに相補な2種のプライマーを、前記プライマーの種類毎にそれぞれ固体表面の異なる区画に、あるいは、前記プライマーの種類毎にそれぞれ異なる反応槽に保持し、前記各区画に、あるいは、前記各反応槽の反応液に、複数種類のdNTPの混合物を加えることにより、前記プライマーを始点とする相補鎖伸長反応が起こり得る状態として、実際に前記相補鎖伸長反応がどの種類の前記プライマーで起こったかを、前記ターゲットDNAにハイブリダイズした前記プライマーを始点とする相補鎖伸長反応で生成されるピロリン酸と化学発光試薬を利用して生じる化学発光を検出比較することにより、前記相補鎖伸長反応が起こった前記プライマーの種類を識別して、前記ターゲットDNAに含まれる1塩基置換(SNPs)を検出することを特徴とする1塩基置換検出方法。

【請求項11】ターゲットDNAにハイブリダイズし、相補鎖伸長能力のない、互いに異なる配列を持つ複数種類の長いオリゴマーを、前記長いオリゴマーの種類毎にそれぞれ固体表面の区画に、あるいは、前記長いオリゴマーの種類毎にそれぞれ異なる反応槽に保持し、前記各区画に、あるいは、前記各反応槽に、相補鎖伸長能力のある5塩基長から8塩基長の範囲の短いオリゴマーを添加して、前記短いオリゴマーを前記長いオリゴマーと直列に前記ターゲットDNAにハイブリダイズさせて、複数種類のdNTPの混合物を更に加えることにより、前記短いプライマーを始点とする相補鎖伸長反応で生成されるピロリン酸と化学発光試薬を利用して生ずる化学発光を検出することにより、前記相補鎖伸長反応が起こった前記短いプライマーの種類を識別して、前記ターゲットDNAに含まれる1塩基置換(SNPs)を検出するあるいは試料中の置換DNAの比率を検出すること特徴とする1塩基置換検出方法。

【請求項12】末端ヌクレオチドの種類がそれぞれワイルドタイプおよびミュータントDNAサンプルに相補な塩基を持つ少なくとも2つの異なるプライマーを、前記プライマーの種類毎にそれぞれ固体表面の異なる区画に保持する複数の前記区画を具備する反応チップ、あるいは、前記プライマーの種類毎にそれぞれ異なる反応槽に保持する複数の前記反応槽が配置される反応槽支持基板と、前記各区画に、あるいは、前記各反応槽の反応液に、複数種類のdNTPの混合物を加えることにより、

前記プライマーを始点とする相補鎖伸長反応が起こり得る状態として、実際に前記相補鎖伸長反応がどの種類の前記プライマーで起こったかを、前記ターゲットDNAにハイブリダイズした前記プライマーを始点とする相補鎖伸長反応で生成されるピロリン酸と化学発光試薬を利用して生じる化学発光を検出する光検出器とを有し、前記相補鎖伸長反応が起こった前記プライマーの種類を識別して、前記ターゲットDNAに含まれる変異を検出することを特徴とするDNA変異検出装置。

【請求項13】ターゲットDNAにハイブリダイズし、相補鎖伸長能力のない、互いに異なる配列を持つ1種あるいは複数種類の長いオリゴマーを、前記長いオリゴマーの種類毎にそれぞれ固体表面の区画に保持する複数の前記区画を具備する反応チップ、あるいは、前記長いオリゴマーの種類毎にそれぞれ異なる反応槽に保持する複数の前記反応槽が配置される反応槽支持基板と、前記各区画に、あるいは、前記各反応槽に、相補鎖伸長能力のある5塩基長から8塩基長の範囲の短いオリゴマーを添加して、前記短いオリゴマーを前記長いオリゴマーと直列に前記ターゲットDNAにハイブリダイズさせて、複数種類のdNTPの混合物を更に加えることにより、前記短いプライマーを始点とする相補鎖伸長反応で生成されるピロリン酸化学発光試薬を利用して生じる化学発光を検出する光検出器とを有し、前記相補鎖伸長反応が起こった前記短いプライマーの種類を識別して、前記ターゲットDNAに含まれる変異を検出することを特徴とするDNA変異検出装置。

【請求項14】(1)ターゲットDNAの特定の配列の領域に相補的な配列を含むプライマーをハイブリダイズさせる工程と、(2)4種類の核酸基質とポリメラーゼとを用いて、前記プライマーを始点として少なくとも複数核酸を連続的に取りこむ相補鎖伸長反応を行なう工程と、(3)前記相補鎖伸長反応の反応副産物として生じるピロリン酸をATPに変換し、酵素を用いて発光基質と発光反応を行なわせて生ずる発光を検出する工程とを有し、前記特定の配列の有無を検出することを特徴とするDNA変異検出方法。

【請求項15】ターゲットDNAの特定の配列の領域に相補的な配列を含み、3'末端から2塩基目、又は、3塩基目の塩基の種類を、前記ターゲットDNA配列と相補的でない塩基を持つプライマーをハイブリダイズさせる工程と、(2)4種類の核酸基質とポリメラーゼとを用いて、前記プライマーを始点とする相補鎖伸長反応を行なう工程と、(3)前記相補鎖伸長反応の反応副産物として生じるピロリン酸をATPに変換し、酵素を用いて発光反応を行なわせて生ずる発光を検出する工程とを有し、前記特定の配列の有無を検出することを特徴とするDNA変異検出方法。

【請求項16】相補鎖伸長能力のある5塩基長から8塩基長の範囲の短いオリゴマーと、ターゲットDNAにハ

イブリダイズし相補鎖伸長能力のない長いオリゴマーとを直列に前記ターゲットDNAにハイブリダイズさせる工程と、(2)4種類の核酸基質とポリメラーゼとを用いて、前記短いプライマーを始点とする相補鎖伸長反応を行なう工程と、(3)前記相補鎖伸長反応の反応副産物として生じるピロリン酸をATPに変換し、酵素を用いて発光基質と発光反応を行なわせて生ずる発光を検出する工程とを有し、前記特定の配列の有無を検出することを特徴とするDNA変異検出方法。

【請求項17】調べようとするDNA領域の配列の1部を含み、ワイルドタイプおよびミュータントに対応した少なくとも二つのプローブあるいはプライマーを用いて検体検査を行い、それらの結果を比較してミューテーションの有無あるいは存在比を調べることを特徴とする方法。

【請求項18】ワイルドタイプとミュータントを識別するのが少なくともプローブあるいはプライマー末端の塩基種の違いである請求項17記載の方法。

【請求項19】ワイルドタイプとミュータントを識別するのがそれぞれに相補で変異部位を含む5マーあるいは6マーである請求項17記載の方法。

【請求項20】ミュータント識別プライマーあるいはプローブをターゲットDNAにハイブリダイズせしめ、相補鎖合成し、得られるピロリン酸を検出する請求項17ないし19のいずれかに記載のSNPs検出方法。

【請求項21】ミュータント識別プライマーあるいはプローブをターゲットDNAにハイブリダイズせしめ、相補鎖合成し、得られる合成されたDNA鎖を分析する請求項17ないし19のいずれかに記載のSNPs検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、被検体のDNA中に含まれる特定の配列の検出、及び遺伝子の多型性の検出、1塩基置換 (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) 分析等に関する。

【0002】

【従来の技術】ゲノム解析計画が進展し、DNA配列情報を医療診断、創薬等の種々の産業に応用しようとする動きが活発化してきている。特に医療分野では遺伝子の機能を解明して活用しようとする動きが活発である。特に、生体内で活動している遺伝子を調べる遺伝子発現プロファイル分析と、遺伝子発現の多様性の原因ではないかと考えられているゲノム中の1塩基置換 (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) の分析が注目されている。

【0003】ゲノム中の1塩基置換は約1000塩基に1つあるといわれており、各個人について膨大な数の1塩基置換が存在する。それらの1塩基置換が、各固体、個人の特性に関連していると考えられ、これら1塩基置

換を解析することにより、病気治療の際の、個人毎の治療方針等が得られると期待されている。

【0004】1人の人間のゲノムに現れる1塩基置換の数は膨大であり、多くの人のゲノムは特定の位置に現れる塩基種が2つあるタイプの多型性で、変異の起こる位置に現れる1塩基置換を調べ、更に、病気等との相関関係を明らかにする必要があるが、膨大なDNAデータの取得が必要であり、それに適した方法の開発が望まれている。

【0005】現在使われている塩基置換分析法は種々有るが、大別して未知の塩基置換を検出する方法と、既知の塩基置換が他の多くのの人に見られるか、病気との因果関係はあるか等を調べる方法に分けられる。

【0006】新たな塩基置換を検出する方法としては、DNAシーケンサーを用いた塩基配列決定、DNAプローブアレー（DNAチップ、又はジーンチップ）を用いてDNAプローブとターゲットDNAのハイブリダイゼーションを利用する方法等が用いられている。

【0007】一方、既に分かった位置の1塩基置換の検出には、SSCP (Single Strand Configuration Polymorphism) 法、インバーダーアッセイ (Nature Biotechnology, 17, 292~296(1999))、DASH (Nature Biotechnology 17, 87~88(1999)) 等の方法が考案され使われ始めている。これらの方法は、何れも光源としてレーザー等を使用する。

【0008】また、プライマーを用いたDNA相補鎖合成を行うときに、プライマーの3'末端がターゲットに相補的であるか否かで相補鎖伸長が進んだり、進まなかったりする。そこで、プライマーの3'末端をミューテーション位置に一致させたプライマーを用いてPCR増幅を行い、生成物をゲル電気泳動などで分析する方法 (ARMS: amplified refractory mutation system; Nucleic Acids Research, 17, 2503-2515(1989)) なども使用されている。この場合、どれだけ正確に目的とするターゲットが有るときだけ相補鎖合成を起こし得るかがキープポイントとなる。

【0009】SSCP法では、1本鎖DNAが電気泳動中にとる形状がミューテーション(変異)の有無で異なり、それに応じて泳動速度に差があることを利用して1塩基置換を検出する。

【0010】インバーダーアッセイでは、DNAプローブアレーのDNAプローブ、ターゲットDNA、DNAプローブで3本鎖を形成してプローブの一部が酵素切断されるか否かを検出する。

【0011】DASHでは、インターカラー共存在下で、ターゲットDNAとプローブDNAをハイブリダイズさせ、光照射によりインターカラーから発する光を、温度を変化させながら観察し、ターゲットDNAに変異がある時には2本鎖が離れて発光が無くなることを利用する。

【0012】一方、短時間に短いDNA塩基配列を決定し、決定されたDNA塩基配列を用いてミューテーションを調べようとする動きも始まっている。

【0013】例えば、Nyrenらは、ターゲットDNAにプライマーをハイブリダイズさせ、相補鎖伸長反応で生成するピロリン酸をATPに変え、ATPにルシフェリンを作用させて発光させ、この化学発光を検出することにより、相補鎖伸長反応で取り込まれた基質(dNTP)を知り、DNA塩基配列を決定する方法(パイロシーケンシング)を提示している。パイロシーケンシングは、ゲル電気泳動を用いない簡易なDNA配列決定法として注目を集めている。更に、最近、パイロシーケンシングを用いたSNPs検出の報告をしている (Anal Biochemistry 280, 103~110(2000))。この方法は、化学発光を利用しているので新たな光源は必要としない。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】ゲノムDNA中に現れる変異は生物の個性、又は病気や医薬品に対する感受性等と関連しており大きな分析対象である。対象となる個人は膨大な数にのぼり簡便で大量処理に適しており、ランニングコストの安い方法、及び装置が求められている。

【0015】また、測定対象も個別ノゲノム試料のSNPs検査の他、病人グループのSNPsや健康人のSNPsを比較する計測が必要である。すなわち、SNPsと病気との因果関係を調べるには特定SNPsについて、これら両グループで見られる当該SNPsの頻度を比較する必要がある。これらを簡便に行うためにはそれぞれのグループのDNAを混合して含まれるSNPsの定量分析をする事がもっとも効率がよいが、そのような精度良い定量分析法が開発課題となっている。さらに、単に個別のサンプルのSNPsを測定する上でも以下の課題がある。

【0016】これまでに提案されている種々方法では、ターゲットとなるDNA領域をPCR増幅し、得られるDNA断片をターゲットとして用いていた。このためPCRは不可欠であるという問題があった。

【0017】DASHではレーザー光源、散乱光除去フィルターを装備した検出器を必要とし、装置が大がかりになるという問題があった。

【0018】化学発光を検出するパイロシーケンシングは、ピロリン酸をATPに変換して化学発光を起こさせ、この発光を検出する方法である。しかし、パイロシーケンシング方法では、4種のdNTP (dATP、dTTP、dGTP、dCTP) をそれぞれ独立に順番に反応部に加えていく必要があるという問題、発光強度が弱いという問題、dNTPの注入機構が必要であるという問題、装置がかなり大がかりになるという問題等あった。

【0019】また、この方法では、試薬を順次注入する

ため、分析時間がゲル電気泳動等より短いとはいえ、10分～20分が必要であるという問題、試料をそのまま用いるには感度が十分ではなく、試料DNAはPCR増幅してターゲット領域のDNAコピー数を増やして使用する必要があるという問題があった。

【0020】また、パイロシーケンシングでは、調べようとする試料中に塩基置換が複数個存在する時は得られるスペクトルが複雑になり塩基置換を明確に分析できない場合があるという問題があった。

【0021】パイロシーケンシングをDNA変異の検出に利用するには、一層の高感度化を実現して、容易にDNA変異を検出できる様にすること、複数種類のミューテーションを含むDNA鎖を分析できる様にすることが重要な課題である。

【0022】発明の目的は、遺伝子診断、遺伝子を用いた創薬、治療の元となるデータベース作製に必要なツールを提供するものであり、遺伝子DNAの検査方法、及び装置、検査試薬等を提供することにある。

【0023】より詳細には、本発明の目的は、高感度で励起光源を必要とせず、反応は単純で時間も短く簡便な、DNA変異検出方法、及び装置、更に、複数の変異を含んだ試料を信頼度高く分析できるDNA変異検出方法、及び装置を提供することにある。

【0024】更に、病気とSNPsの相関関係を簡便にスクリーニングする手法の提供も本発明の目的である。

【0025】

【課題を解決するための手段】本発明では、目的とするターゲットDNAの存在の有無、又は、ミューテーションの存在の有無を調べるために、相補鎖伸長能力のあるDNAプローブ（プライマー）をターゲットDNAにハイブリダイズさせ、相補鎖伸長反応で発生するピロリン酸をATPに変換し発光せしめて、その発光を検出する。ターゲットDNA配列が被検体試料中に存在しなければ相補鎖伸長は起こらず発光は観測されない。

【0026】また、本発明では、DNAプローブの3'末端の塩基がハイブリダイズする位置を、ミューテーションが存在する位置と一致させておき、3'末端の配列が異なるプローブを準備することで、ミューテーションのある場合にだけ相補鎖伸長反応が起こる、あるいは、ミューテーションのある場合だけ相補鎖伸長反応が起らないようにすることができるので、ミューテーションチェックにも用いることができる。これはプライマーを始点とする相補鎖伸長反応が、3'末端のハイブリダイゼーションマッチングが完全か不完全かに強く依存するからである（文献：Kwok S. et al. Nucleic Acids Res 18, 999-1005(1990), Huang M.M. Arnheim N. Goodman M.R. Nucleic Acids Res. 20 4567-4573(1992)）。

SNPs測定ターゲットのDNAテンプレートによるプライマー相補鎖伸長反応オン・オフをより確実にするために、プライマーの3'末端近傍に人為的なミスマッチ

を入れている。相補鎖合成の有無は生成するピロリン酸をATPに変換し、化学発光試薬と反応させ、得られる化学発光を光学的に検出して行う。この測定では、不純物として含まれるピロリン酸あるいは核酸基質の熱分解で得られるピロリン酸が背景光を与えるので、これらを極力除去すると共に、wild typeおよびmutantに相補的な末端塩基種を物2つのプライマーを用いた相補鎖伸長の結果得られる化学発光を検出することで高精度の検出を可能にしている。

【0027】既知のパイロシーケンシングでは、発光強度は1塩基分の相補鎖伸長反応により生じるピロリン酸を利用するため発光強度は弱い。本発明では、数十以上の塩基長にわたって相補鎖伸長反応を進行させ、得られるピロリン酸をATPに変換し化学発光を検出するため、既知のパイロシーケンシングに比較して2桁以上の発光強度が得られる。

【0028】また、相補鎖伸長反応の進行により得られた2本鎖を酵素を用いて分解し、再び相補鎖伸長反応を進行させることを複数回繰り返して、発光強度を増大させることも可能である。これらにより、試料をPCR増幅しなくても特定配列、又は、ミューテーションの有無、および混合ゲノム試料に含まれるミュータントの割合を検出できる。

【0029】本発明では、プライマーを始点とする相補鎖伸長反応の際に相補鎖合成の基質であるdNTPを制御された方法で加え、相補鎖伸長反応に伴って生成するピロリン酸を化学発光により検出し、検査対象のDNA（ターゲットDNA）中の塩基変異の有無、正常種と変異種の存在を検出する。検査対象のDNA中の、塩基置換が出現すると予想される位置に、3'末端が来るように設計され、置換の有無で相補鎖伸長反応が起こったり起こらなかったりするように設計されたプライマーを用いて、塩基配列の置換の有無、塩基変異を簡易な方法で高感度で調べる。

【0030】相補鎖伸長反応が起こる場合には、複数のdNTPを同時に加えて、相補鎖伸長を一度に複数個進めて、大量のピロリン酸を生成し、化学発光強度を増大させて高感度に塩基変異を検出する。

【0031】ターゲットDNAの配列を考慮して、複数のプライマーを準備し、種々プライマーを始点とする相補鎖伸長反応の進行を検出することにより、複数種存在する変異を検出する。また、既知の基準となるDNAの配列に従って、複数のプライマーを区分けして保持し反応させることにより、複数種含まれる塩基置換を信頼度高く分析できる。試料中に種々変異株が含まれる場合には、基準となる塩基配列を参考にして複数のプライマーを用意し、これらをプライマーの種類毎に固体表面に固定して用いる等して、相補鎖伸長反応を行ない変異株の存在状況をモニターすることができる。

【0032】種々の変異が含まれる検体の分析は、従来

技術では非常に困難であったが、本発明によれば、簡便な方法、装置により検出できる様になった。

【0033】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施例を図面を参照して詳細により説明する。

【0034】最初に本発明の前提となる発光機構を関連技術であるパイロシーケンシングを用いて説明する。パイロシーケンシングについて説明する。ターゲットDNAにプライマーをハイブリダイズさせる。DNAポリメラーゼと相補鎖伸長反応での相補鎖合成の基質となるdNTPを加えて相補鎖伸長反応を行なわせる。DNAポリメラーゼによりDNA鎖に相補的な基質が1つづつ取り込まれて相補鎖が伸長される。この時、ピロリン酸が反応副産物として生成する。ピロリン酸はdNTPが1つ取り込まれる毎に1分子生成される。

【0035】ピロリン酸はスルフィラーゼによりATPに変換され、ルシフェラーゼの存在下でルシフェリンを酸化して光を発する。この発光を検出することにより、プライマーを始点とする相補鎖伸長反応が進行したことを知ることができる。4種のdNTPを1種類づつ順番に反応部に加えて、発光が検出されればそのdNTPが取り込まれたことになり、DNAの配列決定をすることができる。

【0036】この時、余剰のdNTPを分解して次の反応の時にじゃまにならないようにする必要があり、アピラーゼを加えることが必須の技術として報告されている(Science 281, 363~364(1998))。この場合、アピラーゼはATPをも分解するので、発光反応と分解反応が競合的におこり発光強度はアピラーゼを入れない時に比べて数分の1になる。この反応を利用して配列決定する場合には、ターゲットDNAは0.2pmol前後の量が必要となる。

【0037】本発明とパイロシーケンシングの大きな違いは相補鎖伸長用のプライマーの3'末端あるいは3'末端近傍が、当該サンプルにハイブリダイズしたときに、ミューテーション位置と相補位置に来るように設計されていることである。相補鎖合成されるDNA鎖部分はミューテーション位置に相補部分を含まない。また、相補鎖合成は連続して複数の塩基が取り込まれて進むものであり、伸長するDNA鎖の配列を識別せずに多量のピロリン酸を得て化学発光試薬と反応せしめ化学発光を得て、高感度検出するところが特徴である。さらに、より確実なSNPs情報あるいは定量的なミュータントの情報を得るために、末端塩基種がミュータントおよびワイルドタイプのDNAの相補塩基に一致するプライマー2種を用いて相補鎖合成反応を行い、化学発光を計測する事の特徴とする。

【0038】(実施例1)図1(a)~(d)は、実施例1を説明する図であり、プライマーの3'末端の塩基種によりハイブリダイゼーションが完全、又は不完全と

なり相補鎖合成が制御されることを説明する図である。

【0039】変異を含むDNAから1本鎖状態のターゲットDNA1を、変異を含まないDNAから1本鎖状態のターゲットDNA2を、それぞれ調製する。ここでは約400塩基長の異なるDNAを用いたが、もちろん、もっと長いDNAを用いても良い。プライマー5の3'末端6の塩基が、ターゲットDNA1、2のミューテーションの有無を調べる位置3の塩基に一致するように設計された10塩基長のプライマー5を用いて、ターゲットDNA1、2にハイブリダイズさせる。DNAポリメラーゼ、相補鎖合成の基質となるdATP、dTTP、dGTP、dCTPを加えて相補鎖伸長反応を行なわせる。図1に示すプライマーは10塩基長であるが、一般的に10塩基長から30塩基長のプライマーが使用される。

【0040】図1(a)に示す例では、プライマー5の3'末端6の塩基(G)と、ターゲットDNA2のミューテーションの有無を調べる位置3の塩基(C)とが相補であり、DNAポリメラーゼによりDNA鎖に相補的な基質が取り込まれていき、矢印8に示すように、伸長相補鎖が形成される。この結果、ピロリン酸が反応副産物として生成する。

【0041】図1(b)に示す例では、プライマー5の3'末端6の塩基(G)と、ターゲットDNA1のミューテーションの有無を調べる位置3の塩基(A)とが相補でないため、DNAポリメラーゼによりDNA鎖に相補的な基質が取り込まれにくく、相補鎖伸長は起こりにくい。この結果、反応副産物として生成するピロリン酸は少ない。

【0042】先に説明したように、ルシフェラーゼによる発光を用いてピロリン酸を検出することにより、図1(b)に示す例では強い信号が検出されず、図1(a)に示す例では強い信号が検出される。

【0043】しかし、ターゲットによっては3'末端が相補的でなくても鎖伸長がかなり高い確率で進むことがあり得る。

【0044】そこで、より正確に変異を検出するため、すなわち、末端塩基種による相補鎖合成のスイッチングをより正確にする為に、プライマー5の代わりにプライマー9を使用する。プライマー9の配列は、プライマー5の配列の3'末端6から5'末端方向に2塩基目、又は、3塩基目の核酸塩基の種類を、ターゲットDNA1、2の配列と相補的でない配列(A)とした点のみが、プライマー5の配列と異なる。

【0045】図1(c)、図1(d)に示すプライマー9は、3'末端6から3塩基目の核酸の種類が、ターゲットDNA1、2の配列(C)と相補的でない配列(A)であり、プライマー9は、3'末端6から3塩基目の位置で、人工的なミスマッチが起こる構成を持つ。こうすると、プライマー9の3'末端6がミスマッチの

状態では、プライマー9の3'末端6はターゲットDNA Aから遊離してしまう。これによりプライマー9の3'末端の相補鎖伸長反応が、ミスマッチの有無に、より敏感に影響されるようになる。

【0046】図1(c)に示す例では、プライマー9の3'末端6の塩基(G)と、ターゲットDNA2のミューテーションの有無を調べる位置3の塩基(C)とが相補である。この場合、プライマー9のターゲットDNA1のミューテーションの有無を調べる位置3'末端6から3塩基目の位置で、人工的なミスマッチの塩基(A)がターゲットDNA2のその位置での塩基と相補でなくても、DNAポリメラーゼによりDNA鎖に相補的な基質が取り込まれていき、伸長相補鎖8が形成される。この結果、ピロリン酸が反応副産物として生成する。

【0047】図1(d)に示す例では、これに対して、プライマー9の3'末端の塩基6(G)と、ターゲットDNA1のミューテーションの有無を調べる位置3の塩基(A)とが相補でない。この場合、プライマー9のターゲットDNA1のミューテーションの有無を調べる位置3'末端6から3塩基目の位置で、人工的なミスマッチの塩基(A)がターゲットDNA2のその位置での塩基と相補でないため、プライマー9の3'末端に更にミスマッチが起こると相補鎖伸長反応は非常に起こりにくくなり、伸長相補鎖が形成されない。この結果、ピロリン酸が反応副産物として生成することはない。図1(b)と図1(d)とでは、いずれの場合でも、ターゲットDNA1のミューテーションの有無を調べる位置3'末端6から伸長相補鎖が形成されない相補鎖が形成されないように表示してあるが、図1(b)の場合にはターゲットの塩基配列によっては相補鎖伸長があり得る。たとえば、図2には種々プライマーを用いたときの相補鎖伸長の起こる割合(頻度)を示している。完全な相補配列を持つプライマーSNP1-1を用いたときに得られる発光強度を100としたとき、末端塩基種が変化(ミスマッチ)したときの発光強度を示す。末端塩基種がミスマッチでもかなり相補鎖伸長があることが分か

る。一方、図1(d)では3'末端から3塩基目に人工的なミスマッチを入れている。このようにすると末端にミスマッチがある物は末端近傍に二つのミスマッチがあることになり、より確実に相補鎖伸長を行わない。具体的には図2のプライマーSNP2-i(i=1-4)を用いたときの発光強度に見ることができる。末端がマッチするプライマーSNP2-1では発光強度は完全マッチのときと比べてほぼ同じであるが、末端にミスマッチがあると発光強度は非常に弱くなる。この値はほぼ試液中に含まれる不純物に依る発光強度に等しい。すなわち、末端近傍に少なくとも2つのミスマッチがあると相補鎖合成は殆ど行われぬ。また、ミューテーションの位置に対応するプライマーの部位を末端から3塩基目として、プライマー末端にミスマッチを導入する形のプライマーを用いても同じようなことを行うことができる。すなわち、図1(d)の場合には、図1(b)の構成に比し、プライマー9がターゲットDNA1のミューテーションの有無を調べる位置3'末端6から3塩基目の位置と3'末端6とで、相補でないため、より確実に伸長相補鎖を形成しないものとなる。

【0048】先に説明したように、ルシフェラーゼを用いてATPとルシフェリンを反応させて発光させ、この発光を検出してミューテーションを調べる。即ち、図1(d)に示す例では変異が検出されず、図1(c)に示す例では変異が検出される。

【0049】図2は、実施例1で使用したプライマー5、プライマー9の構成例と、後述するように、それぞれのプライマーによる伸長相補鎖の形成に応じた発光強度を説明する図である。

【0050】プライマー5として、3'末端の塩基が異なる以下の4種類(プライマー名:SPN1-i,i=1,2,3,4)を評価に使用した。プライマーSPN1-i(i=1,2,3,4)は、配列番号1,2,3,4の20塩基長の塩基配列を持つ。

【0051】

AGTTTAAAGA GGGTTGTTGT : (配列番号1)  
AGTTTAAAGA GGGTTGTTGC : (配列番号2)  
AGTTTAAAGA GGGTTGTTGG : (配列番号3)  
AGTTTAAAGA GGGTTGTTGA : (配列番号4)

プライマー9(SNP2-i(i=1,2,3,4))として、人工的なミスマッチが起きるように、プライマー5の3'末端から5'末端方向に3塩基目の核酸の種類TをAに変えた以下の4種類(プライマー名:SPN2

-i,i=1,2,3,4)を評価に使用した。プライマーSNP2-i(i=1,2,3,4)は、配列番号5,6,7,8の20塩基長の塩基配列を持つ。

【0052】

AGTTTAAAGA GGGTTGTAGT : (配列番号5)  
AGTTTAAAGA GGGTTGTAGC : (配列番号6)  
AGTTTAAAGA GGGTTGTAGG : (配列番号7)  
AGTTTAAAGA GGGTTGTAGA : (配列番号8)

以下に、実際に種々のミューテーションが入った試料DNAでテストした結果の一例を説明する。

【0053】図3は、ミューテーションがあるターゲットDNAの検出例を示す図であり、プライマーに応じた

相補鎖伸長反応に伴って反応副産物として生成するピロリン酸の有無を示すルシフェラーゼによる相対発光強度を示す図である。

【0054】ターゲットDNAはミューテーションを持

TCAAAATTCT CCCAACAAACA

図3(a)は、人工的に3'末端から5'末端方向の3塩基目にミスマッチを入れていないプライマー5(プライマーSPN1-i(i=1, 2, 3, 4))を用いた場合の発光の相対強度を示す図、図3(b)は、人工的に3'末端から5'末端方向の3塩基目にミスマッチを入れたプライマー9(プライマーSPN2-i(i=1, 2, 3, 4))を用いた場合の相対発光強度を示す図である。図3(a)、図3(b)に示す縦軸は、プライマーSPN1-1を使用した場合の発光強度を100とした相対発光強度を示す。プライマー名称、SPN1-i(i=1, 2, 3, 4)、SPN2-i(i=1, 2, 3, 4)のあとのカッコ()内に示す数値は、相対発光強度を示す。図2に示した相対発光強度はこの値である。

【0056】図3(a)、図3(b)に示す横軸は、相対発光強度の時間変化を示し、時間軸の下側に示す時間スケールが1分(1min)である。相対発光強度を示す各曲線37, 38, 39, 40および41, 42, 43, 44の時間軸の起点に於いて、DNAポリメラーゼ、相補鎖合成の基質となるdATP, dTTP, dGTP, dCTPが、ターゲットDNA、プライマーを含むバッファ液に加えられ、相補鎖伸長反応が開始され、時間の経過とともに反応が進行することを示す。

【0057】図3(a)に示すように、人工的なミスマッチを入れていないプライマー5(プライマーSPN1-i(i=1, 2, 3, 4))を用いた場合では、曲線37~40に示すように、プライマーSPN1-1による相補鎖伸長反応に関する曲線37と、SPN1-i(i=2, 3)による相補鎖伸長反応に関する曲線38, 曲線39との区別がつけにくい結果となった。即ち、プライマーSPN1-2およびプライマーSPN1-3は、プライマーの3'末端の塩基とターゲットDNAのこの位置の塩基とがミスマッチするにもかかわらず、相補鎖伸長反応が進行したことを示している。もちろん、プライマーSPN1-2およびプライマーSPN1-3による発光はプライマーSPN1-1による発光より低レベルであるから、識別できないわけではないが、高い精度でミュータントとワイルドタイプを識別したり、サンプル中に含まれるそれらの比率を精度良く求めることはできない。

【0058】一方、図3(b)に示すように、人工的に3'末端から5'末端方向の3塩基目にミスマッチを入れたプライマー9(プライマーSPN2-i(i=1, 2, 3, 4))を用いた場合では、曲線41~44に示すようにプライマー選択性が上がり、プライマーSPN

ち、配列番号9の20塩基長の塩基配列を含んでいる。配列番号9の表示された塩基配列部分の3'末端がミューテーションによりCから変異してAとなっている。

【0059】

:(配列番号9)

2-1に関する曲線41では、曲線37と同程度の発光強度が得られ、プライマーSPN2-i(i=2, 3, 4)に関する曲線42, 43, 44では、殆ど発光が検出されていない。

【0059】このように、人工的に3'末端から5'末端方向の3塩基目にミスマッチを入れたプライマー9(プライマーSPN2-i(i=1, 2, 3, 4))を用いることにより、ミューテーションの塩基配列を、より厳正に、検出できる。

【0060】図3(a)、図3(b)に於いて、プライマー5(SP1-i(i=2, 3, 4))に関する曲線37, 38, 39およびプライマー9(プライマーSPN2-1)に関する曲線41は、相補鎖伸長反応により約400個の相補鎖合成がなされたことを示しており、発光曲線は極大に達した後に、発光が減少して行く。ここで検出される発光は、相補鎖伸長反応で放出されるピロリン酸を化学発光させたものである。

【0061】より正確にSNPsを検出したり、ワイルドタイプの遺伝子とミュータント遺伝子が共存するサンプル中のそれらの比率を求めるにはそれぞれに最適のプライマー合計2種を少なくとも用いる。この場合、ミューテーションはC Aの形で起こる例なので、プライマーSNP2-1とSNP2-3が用いられる。SNP2-1はミュータントにハイブリダイズして相補鎖合成を起こすが、ワイルドタイプでは相補鎖合成を起こさない。一方、SNP2-3はワイルドタイプにハイブリダイズして相補鎖合成をするが、ミュータントに対しては相補鎖合成をしない。表でミュータントに対してハイブリダイズさせたときに観測される発光強度は不純物と核酸基質(dNTP)の分解により生成したピロリン酸に依る背景光で、バックグラウンド処理すればゼロとなる。ワイルドタイプとミュータントを両方含むゲノム混合試料などではワイルドとミュータントの存在比を知ることが重要である。とくに、病気とSNPsの関連を調べるには病人のゲノム中に現れる注目しているSNPsの出現頻度と健康人のゲノムに現れるそのSNPsの出現頻度を比較し、SNPsと病気の相関関係を調べる必要がある。このためには非常に多くの検体についてSNPs解析をする必要がある。SNPsの数は多いので膨大なデータを取得する必要がある。このような場合、病人のゲノム同士、健康人のゲノム同士を混合してSNPsを測定し、病気との相関を調べる方法が効率よい。通常、有意なSNPsは出現確率が1%以上であり、病気との相関を有意と見るのは5%以上である。すなわち、混合ゲノム試料において、SNPsの存在比を1%程度



の精度で測定する必要があるが、これまでの方法ではこれは困難であった。ここで開発した方法を用いて、2つのプライマーを用いてそれぞれの相補鎖伸長反応の割合を知ることにより、1%内外の精度で存在比を決定する事ができる。上記の内容を示す実験結果を図3(c)に示す。図3(c)はワイルドタイプとミュータントの両方を含むゲノム混合試料を本発明により測定した結果である。ワイルドタイプとミュータントの総ゲノム量を一定としてその内のミュータントの存在比を横軸にとり、そのときに得られるワイルドタイプ由来の信号強度(図中○を付したデータ)とミュータントの信号強度(図中△を付したデータ)をあらわしている。ワイルドタイプとミュータントのそれぞれに特異的なプライマーを用いて反応を行わせて測定した。結果から分かるように、ミュータントの比率が上がるとワイルドタイプ由来の信号が低下し、ミュータント増加する。S/N比を考慮するとミュータントが1%程度の比率でも検出が可能である。健常と病気との相関において必要な検出比率は、上記のごとく5%なので、本発明は十分な精度を持って検出できることは明らかである。

【0062】この測定精度をさらに高めるために、2本鎖DNAの両方の鎖について、合計4種のプライマーを用いてSNPs検出をおこなうことが有効である。

【0063】図4は、本発明の実施例1の化学反応の概要を説明する図である。図4(a)は反応容器200のバッファ液中にターゲットDNA45とプライマー46が導入された状態を示す。図4(b)は、その反応容器200のバッファ液にDNAポリメラーゼ、相補鎖合成の基質となるdNTP(dATP、dTTP、dGTP、dCTP)が加えられ、矢印48で示すように、相補鎖伸長反応が進行する状態を示す。この際、さらに、APS(アデノシン5'-ホスホスルフェート)、ATPスルフィラーゼおよびルシフェリンも加える。図4(c)は、相補鎖伸長反応が進行する場合の化学式を示すものであり、ターゲットDNA45、プライマー46および基質となるdNTP47にDNAポリメラーゼが作用して、未反応のターゲットDNA45および伸長相補鎖48とターゲットDNA45による二本鎖の合成DNAに合わせてピロリン酸(PPi)49が生成される。生成されるピロリン酸(PPi)49の分子数は伸長相補鎖48の形成時の塩基長に比例して取り込まれるdNTP47と等しい。図4(d)は、生成されたピロリン酸(PPi)49の各分子がAPSの存在下でATPスルフィラーゼによりATP50に変換される状態を示す。なお、このとき、同時に、硫酸イオンが生成される。図4(e)は、変換されたATP50がルシフェラーゼの共存下でルシフェリンを酸化して光51(hν)を発する。この際、炭酸ガスが発生するとともに、ピロリン酸はATPに変換され、ATPはルシフェリンを酸化しピロリン酸PPi49'を生成する。PPi49'

は、ATPスルフィラーゼの働きで、再び、ATP50となりルシフェリンと反応する。相補鎖伸長反応が400塩基までなされるとすると、1つのターゲットDNAに対する相補鎖伸長反応で400分子のピロリン酸49が生成する。ATPは反応によりAMP(adenosine monophosphate; アデノシン・一リン酸)とピロリン酸に変換される。ピロリン酸は再びATPに変換され、発光反応を繰り返すので、発光は継続する。

【0064】相補鎖伸長反応以後のATP生成反応は、図3で得られている発光強度のデータを参照して分かるように、十分なAPS、ルシフェリン、O<sub>2</sub>があれば過渡的に継続するため、更に発光反応が続く、発光51が持続する。発光強度51はピロリン酸49の生成量、即ち、伸長相補鎖48のDNA鎖長に比例する。

【0065】この実施例1では、相補鎖合成の基質dNTP47はN(=A、T、G、C)の4種を全て混合して、DNAポリメラーゼとともに、1本鎖状態のターゲットDNA45、プライマー46を含む反応液中加入することができるから、段階的反應でDNA配列決定を行なうパイロシーケンシングに比べると、2桁以上の高い化学発光量が得られ高感度が達成できる。パイロシーケンシングの場合には、相補鎖合成の基質dNTPはそれぞれN(=A、T、G、C)の種類毎に独立に順番に反応部に注入しなければならない。

【0066】図5(a)は、1本鎖状態のターゲットDNAに図2に示すプライマー9(人工的なミスマッチを入れたプライマーを使用)を結合させて、何れか1種類のN(=A、T、G、C)の基質dNTPのみ、又はddNTPのみを用いて1塩基のみの相補鎖伸長反応を行なわせた場合(パイロシーケンシングの場合)に得られる発光強度(図にdGTPと表示)と、実施例1の方法により得られる、4種類のN(=A、T、G、C)の全ての種類の基質dNTPを同時に用いて長い領域にわたって相補鎖伸長反応を行なった場合に得られる発光強度(図にdNTPsと表示)とを比較した図である。試料は3fmolのM13である。図5(b)は、試料を加えないで、図5(a)と同じ条件で得たバックグラウンドデータを示す。

【0067】この例では試料中にApyraseを共存させ、ATPおよびppiを分解しているので、発光反応と分解反応が競合するので強度は低くなり、また、持続せず減少している。試料DNA、酵素中あるいはdNTP(核酸:デオキシリボ核酸)やddNTP(ダイデオキシリボ核酸)には不純物としてピロリン酸が含まれることも多く、背景光を与える。Apyraseを加えるとこれらは分解され、背景光は無くなる。含まれるピロリン酸をあらかじめ除去するとApyraseを加える必要は無く、ピーク値の数倍の信号強度が持続する。

【0068】図5(a)、図5(b)の縦軸は発光強度を、横軸は発光強度の時間変化を示す。図5(a)に於

いて、4種類のdNTPを加えて相補鎖伸長反応を行ない、遊離する多量のピロリン酸を化学発光させた時の発光強度は、dGTPのみを加えて1塩基のみを伸長させた時に遊離するピロリン酸を化学発光させた時の発光強度の約50倍である。この比較からも、本実施例1により高感度化が可能ながわかる。

【0069】更に、詳しく説明すると、図5(b)のバックグラウンドデータを考慮すると、dGTPのみを加えた時は、図5(a)の信号強度と図5(b)のバックグラウンドデータの値が同等で、実質的に試料DNA(M13)を検出することができない。しかし、4種類のdNTPを加えた時の図5(a)の信号強度は、図5(b)のバックグラウンドデータの値に対して、12倍の値を示している。測定ノイズは信号強度の1/78であったので、実際、アトモレベルでのDNAの1塩基変異の検出が可能である。これはPCR増幅せずに検出できる十分な信号レベルであると言える。

【0070】このような微量のDNAを計測する時に問題となる背景光は、試薬中に含まれているピロリン酸やdNTPが分解して生成するリン酸である。これらリン酸を除去するために、予め反応に使用する試薬をアピラーゼで処理し、背景光を少なくした。

【0071】(実施例2) 実施例2は隣接する2つのDNAアローブを一つのプライマーとして用いる例である。即ち、図2に示すプライマー9のように、プライマー自体にミスマッチを入れる代わりに、プライマーの長短2種を隣接させてターゲットDNAにハイブリダイズさせる方法である。短いプライマーはミスマッチがあるとハイブリダイズしにくくなることを利用する。

【0072】図6は、実施例2を説明する図である。実施例2では、ターゲットDNAと安定にハイブリダイズするのに十分な長さを持つ第1のアローブと、単独では短くてハイブリダイズして相補鎖合成できない長さを持つが、第1のアローブの3'末端に密着してターゲットDNAとハイブリダイズすることができる第2のアローブを用い、両者を密着して隣接させてプライマーとする。図6は、第1のアローブの3'末端と第2のアローブ5'末端とを密着して隣接させたプライマーの第2のアローブの3'末端を始点とする相補鎖伸長反応を行なわせてルシフェラーゼによる発光を用いてミュートーションを検出する例である。

【0073】図6(a)に示すように、第1のアローブ61は、1本鎖状態のターゲットDNA63と安定にハイブリダイズするのに十分な長さである15塩基長から30塩基長を持つ。第1のアローブは全てのターゲットDNAと1塩基置換の有無にかかわらずにハイブリダイズするので、第1のアローブは相補鎖伸長しないように3'末端がダイデオキシヌクレオチド64とされている。

【0074】もう一つの方法として、まず、短いオリゴ

マーを長いオリゴマーに直列になるようにハイブリダイズさせる。ついで、ライゲーション反応によりこれらを結合する。この時、ワイルドタイプに相補的な短いオリゴマーとミュータントに相補的な短いオリゴマーとを用意し、反応を行う。ワイルドタイプに相補なオリゴマーの3'末端をダイデオキシヌクレオチドとして相補鎖伸長ができない形にしておく。検体がミュータントの時だけ、オリゴマーがライゲーションで結合し、相補鎖伸長が起こるがワイルドタイプでは伸長が起こらない。このようにしてワイルドタイプとミュータントを識別しても良い。

【0075】図6(b)に示すように、第1のアローブ61の3'末端に密着して、5塩基長から6塩基長の長さを持つ第2のアローブ62が、ターゲットDNA63にハイブリダイズする。第2のアローブ62は5'末端がリン酸基67とされており、容易に第1のアローブ61の3'末端に密着する。第2のアローブ62の3'末端は相補鎖合成の始点となり得るが、単独ではハイブリダイズしても、短くて、相補鎖合成できない長さとしておく。

【0076】第2のアローブ62は、第1のアローブ61に密着して隣接してターゲットDNAとハイブリダイズした場合にのみ安定化してプライマーとして機能することが可能である。実施例2の方法では、第1のアローブ61と第2のアローブ62とがターゲットDNA63にハイブリダイズした時だけ、n個の伸长相補鎖66が形成され、n分子のピロリン酸68が生成する。すなわち、2つのアローブが密着して隣接してターゲットDNAにハイブリダイズすることで高い選択性を得ることができる。ここでも、第1の実施例と同様に、第1のアローブ61と第2のアローブ62とよりなるプライマーの3'末端の塩基6が、ターゲットDNA63のミュートーションの有無を調べる位置35にくるように設計されることである。図6(b)では、ターゲットDNAは図1(a)に示したように、第1のアローブ61と第2のアローブ62よりなるプライマーがターゲットDNA63とハイブリダイズしたとき、プライマーの3'末端にある塩基6(G)と、ターゲット位置の塩基35(C)とが相補なので相補鎖伸長反応が生ずる。すなわち、置換がないワイルドタイプについて相補鎖伸長反応が起きる例である。

【0077】図6(c)は、これに対して塩基置換が生じたミュータントのDNAにハイブリダイズした例で、相補鎖伸長反応が起きない。図6(c)に示す例では、プライマーの3'末端にある塩基6(G)と、この位置に対応するターゲットDNAの位置の塩基35(A)とは相補でない。したがって、図1(b)で説明したと同様に、プライマーのハイブリダイズによる伸长相補鎖が形成されることは無い。本実施例では、図1(b)で説明した場合と異なり、図3(a)のプライマーSNP1

ー2あるいはSNP1-3のように相補でないにもかかわらず伸长相補鎖が形成されることは無い。これはプライマーを二つのプローブ61、62の合成とすることの効果である。

【0078】図6(d)に示すように、本実施例2では、第2のプローブ62がハイブリダイズすべきターゲットDNA63の部位の何れかの位置に、ミューテーション69(図6(d)の例では、塩基G)があり、第2のプローブ62の3'末端から3塩基目の塩基がTであるので、ハイブリダイゼーションは不安定になる。すなわち、第1のプローブ61と第2のプローブ62よりなるプライマーが安定に形成されないことになるので、仮に、プライマーの3'末端にある塩基6(G)と、この位置に対応するターゲットDNAの位置の塩基35

(C)とが相補であったとしても、伸长相補鎖は形成されない。これもプライマーを二つのプローブ61、62の合成とすることの効果である。ここで、ミューテーション69(図6(d)の例では、G)がある場合には、ターゲットDNA63の部位65の配列に対し、第2のプローブ62の配列に完全に相補である場合、図6(d)の例では、第2のプローブ62の3'末端から3塩基目の塩基がCである場合のみ、ハイブリダイゼーションは安定となり伸长相補鎖が形成されることはいうまでも無い。

【0079】従って、実施例1と同様にして、ピロリン酸68の生成の有無を発光の有無により調べることににより、ミューテーションの有無を検出できる。もちろん、逆にミューテーションがある時だけ相補鎖伸長するようにプライマー62を設計しても良い。

【0080】実際にはワイルドおよびミュータントに相補的な短いプライマーを用いた反応をそれぞれ行い、両者の結果を用いてSNPsの分析あるいはその存在比を決めるのがよい。

【0081】また、第1のプローブの3'末端にミューテーションの位置が対応するようにして、ミューテーションが存在する時は、第2のプローブが第1のプローブに密着して隣接してターゲットDNAにハイブリダイズできない形としても良い。

【0082】(実施例3)SNPsを調べるには、血液サンプルからDNAを抽出し、種々の検査にしようできるようにライブラリーとして保存したり、平均数kbの長さのDNAに切したDNAをPCR増幅して検査サンプルとして保存する。種々SNPsの検査にあったっては保存されたDNAサンプルの一部を取りだし、必要な短い領域のDNA(100-200b)を再度PCR増幅して用いる。しかし、測定の旅に行く増幅は手間と時間と費用がかかり、PCR増幅のいらぬ方法が望まれている。本方法は相補鎖伸長を行い、一度に多量のピロリン酸を生成して化学発光反応に利用するので高感度で得られる。相補鎖合成が1kb程度行われ、サンプル量

も0.1fmol以下で計測ができ、PCR無しで計測できる場合も有る。更に高感度にしてPCRを行わないで済む例が実施例3である。

【0083】実施例3は、実施例1、実施例2で生成した伸长相補鎖を酵素切断して、再度、相補鎖伸長反応を行なうことにより、一層多くのピロリン酸を生成して検出感度を向上させた例である。

【0084】図7は、実施例3を説明する図であり、伸长相補鎖を酵素切断して、再度、相補鎖伸長反応を行なうことにより、非常に多くの分子数のピロリン酸を生成して検出感度を向上させる原理を説明する図である。

【0085】まず、最上段に示すように、5'末端をビーズ等の固体担体81に固定したターゲットDNA85とプライマー86をDNAポリメラーゼとともにバッファ液中におく。その結果、図4(c)で説明したと同様に、プライマー86の伸长相補鎖82が形成されるとともにピロリン酸87が生成される。ただし、この実施例3では、実施例1と異なり、プライマー86の相補鎖82の伸長段階では発光に関する酵素類はバッファ液に入れない。

【0086】次いで、所定の相補鎖82の伸長が進んだ段階で相補鎖伸長反応は終了し、プライマー86の伸长相補鎖82により形成された相補鎖83とターゲットDNA85による二重鎖のDNAが形成される。この状態で、バッファ液中に、相補鎖を酵素切断するためのエキソヌクレアーゼを投入する。この結果、プライマー86の伸长相補鎖82により形成された相補鎖83は、エキソヌクレアーゼ反応により、1つずつヌクレオチド84に分解され、最終的にターゲットDNA85が再び得られる。

【0087】相補鎖を酵素切断するエキソヌクレアーゼについて説明しておく、エキソヌクレアーゼにはDNA鎖の5'末端から3'末端へ1つずつヌクレオチドを分解していく5'→3'エキソヌクレアーゼと、DNA鎖の3'末端から分解していく3'→5'エキソヌクレアーゼがある。プライマーの3'末端のマッチ、ミスマッチを相補鎖合成の有無の検出に利用する場合には、3'→5'エキソヌクレアーゼは都合が悪い。プライマーのミスマッチ部分が削り取られ、正常株と変異株の差が区別できなくなるからである。5'→3'エキソヌクレアーゼは、2本鎖DNAの5'末端からDNA鎖を分解するが、ターゲットDNA85の5'末端をビーズ等の固体担体81に固定したり、5'末端を修飾して、5'→3'エキソヌクレアーゼによりターゲットDNAが分解を受けないようにしておく。3'末端のミスマッチによる変異の識別を行なう場合には、5'→3'エキソヌクレアーゼが適している。

【0088】バッファー中に余剰に存在するプライマー86はこのターゲットDNA85に、再び、ハイブリダイズして、プライマー86の伸长相補鎖82が再度形成

される。これにより新たにピロリン酸87が生成される。

【0089】プライマー86の伸長相補鎖82の形成により、 $n$ 分子のピロリン酸87が生成されるものとする。伸長相補鎖82の形成、相補鎖83の、 $5' \rightarrow 3'$ エキソヌクレアーゼ反応による分解の繰り返しを $m$ 回行なうものとする、合計 $m$ 回の伸長相補鎖82の形成により、 $(m \times n)$ 分子のピロリン酸88が生成されることになる。

【0090】 $(m \times n)$ 分子のピロリン酸88が生成された後に、発光に関する酵素類をバッファ液中に投入すると、ピロリン酸88はATPに変換され、ATPはルシフェリンを酸化しピロリン酸PPiを新たに生成する。新たに生成するPPiは、ATPスルフィラーゼの働きで、再び、ATPとなりルシフェリンと反応する。従って、 $m=10$ とすれば、1回のピロリン酸生成は1つのDNA相補鎖を作るときに約1000個放出され、これが10回繰り返されるので、発光量はパイロシーケンシングなどに比べて10000倍となる。

【0091】伸長相補鎖82の形成と、相補鎖83の分解は同時進行しても良く、この場合には $5'$ エキソ活性を持つDNAポリメラーゼを用いるのが良い。上述した $5' \rightarrow 3'$ エキソヌクレアーゼに代えて、 $3' \rightarrow 5'$ エキソヌクレアーゼを用いて、上記と同様に、伸長相補鎖82の形成と、相補鎖83の分解を繰り返す場合には、プライマー86の $3'$ 末端をエキソヌクレアーゼで分解されないように、リン酸結合に代わりサルファー結合としておく。エキソヌクレアーゼによりミューテーションをチェックすべき位置に相補的なプライマー中のヌクレオチドが分解除去されるのを防ぐためである。強い $3'$ エキソヌクレアーゼ活性があるDNAポリメラーゼを用いると都合が良い。

【0092】何れの場合も、ターゲットDNA85にプライマー86をハイブリダイズさせる。プライマー86の $3'$ 末端のマッチ、ミスマッチにより相補鎖伸長反応を進行させたり、進行しないようにしたりして、ミューテーションの有無を調べる。プライマー86の $3'$ 末端の近傍に、必要に応じて人工的にミスマッチができるように配列を工夫する等により、正確にミューテーションを調べることができる。

【0093】(実施例4) 実施例4は、複数のプライマーを用いる例である。ミューテーションの種類を決めたり、確実にどのようなミューテーションが起こっているのか、又は、ミューテーションの起こる割合を知るには、1つのプライマーを用いて伸長相補鎖が形成されたか否かを調べるだけでは十分でない。

【0094】そこで対象となるDNA2本鎖の両鎖にあらわれるミューテーションを調べることが望ましい。両鎖のワイルドタイプおよびミュータントに相補的なプライマー合計4種を用いて、伸長相補鎖が形成されるか否

かを調べることが有効である。

【0095】これら4種のプライマーを始点とする相補鎖伸長反応は、それぞれ独立に、しかし、同じ条件下で行ない得られる化学発光の強度を比較検討することにより、変異株の存在比等の情報が得られる。反応条件を同じにするため、4種、又は複数のプライマーは、固体表面の異なる位置に種類毎に固定されたり、異なるビーズに種類毎に固定され、空間的に分離された状態で同じ反応液中で相補鎖伸長反応を行なわせる。もちろん、分離された小さな反応セルにプライマーをそれぞれ入れて反応させても良い。また、反応液は各セル間を移動できるが、プライマーはビーズなどに固定されセルの間を移動できないようにした反応部を用いても良い。また、4種のプライマーだけでなく種々のSNPsを同時に検出できるように、いろいろなSNPsに対応したプライマー群を同時に検査しても良い。また、一つあるいは幾つかのSNPsについて、多くの人々のゲノムを検査しても良い。相補鎖伸長反応により生成されるピロリン酸、及びピロリン酸から生成するATPを媒介として発する化学発光を、プライマーの種類毎に区別して観測する。

【0096】図8、図9は実施例4のDNA変異検出装置の構成例を説明する図であり、図8は鳥瞰図を、図9は図8の一点鎖線9-9に示す位置で断面をとり矢印方向(Y方向)に見た断面図である。

【0097】本実施例では、底面が透明である反応チップ101上に区分けされた反応セル102-i、103-i、104-i、105-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) が形成され、その内部に、プライマーが固定されたビーズ106-i、107-i、108-i、109-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) が、プライマーの種類毎に保持されている。一方、反応液セル100-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) が反応セル102-i、103-i、104-i、105-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) に並行して形成されるとともに、対応する位置にある反応液セル100と反応セル102とは底部で連通するものとされている。反応液セル100-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) には、1本鎖状態のターゲットDNAを含む反応液110-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) が注入される。反応液セル100と反応セル102とは底部で連通するものとなっているから、反応液セル100-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) に注入された反応液110-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) は、反応セル102-i、103-i、104-i、105-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) に供給されることになる。

【0098】相補鎖伸長反応に先立って、プライマー-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) とターゲットDNA-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) とを、それぞれ十分にハイブリダイズさせる。この後、反応液セル100-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) にそれぞれ、4種のdNTP混合溶液を加えて相補鎖伸長反応を開始する。

【0099】相補鎖伸長反応によって得られる化学発光は、反応チップ101の透明な底面に配置されたレンズ111、ラインセンサー、又は2次元センサーの光検出器112で、反応チップ101の透明な底面から検出する。ラインセンサー112を使用する場合には、検出器支持台113を反応チップ101の底面に沿って走査して発光を計測する。2次元センサーを使用する場合には、検出器支持台113の走査は必要ない。

【0100】また、上述の光の検出機構を反応チップ101の上面に配置することもできるのは当然である。さらに光の検出に光電子増倍管を用いてこれを反応チップ101の底面または上面に沿って走査して、順次各反応セル毎に発光を計測しても良い。

【0101】図8、図9に示すDNA変異検出装置では、同時に複数種類のターゲットDNAについての分析を行なうことができる。

【0102】以上の説明では、3' 末端の塩基の種類を変えたプライマーの例を説明したが、ターゲットDNAの異なる位置で起こる塩基置換の検出のため、異なるプライマーを複数種類用意して、ターゲットDNAの異なる位置にある塩基置換を、一括して検出するのにも有効に活用できる。この場合には、反応チップ101は少なくとも、プライマーの種類の数だけの、複数個の反応セルをX方向に設ける構成とする。

【0103】また、装置構成を簡単にするため、回転テーブル上に反応部を保持する構成としても良い。

【0104】図10は、実施例4のDNA変異検出装置の他の構成例を説明する図である。図10に示す構成では、円形の回転テーブル121上の動径方向に、4個の底部が透明な反応槽122-i、123-i、124-i、125-iが保持されている。反応槽の中には、各々異なるプライマーが表面に固定されたビーズが入っている。反応槽122-i、123-i、124-i、125-iの底面積は同じである。

【0105】円形の回転テーブル121上の周方向に、複数の反応槽122-i、123-i、124-i、125-i ( $i=1, 2, \dots, N$ ) が保持されている。反応槽122-i、123-i、124-i、125-i

```
TGGTAATCTA CTGGGACGGA AACAGCTTTG
AGGTGCGTGT TTGTGCCTGT CCTGGGAGAG
ACCGGCGCAC AGAGGAAGAG AATCTCCGCA
AGAAAGGGGA GCCTCACCAC GAGCTGCCCC
CAGGGAGCAC TAAGCGAGGT AAGCAAGCAG
GACAAGAA
```

: (配列番号10)

ミューテーションに対応して、図11に示した長いオリゴマー142、144、146、148を用意する。ここでは簡単のため片側のDNA鎖についての説明をするが、検体2本鎖DNAの両方の鎖について検出を行い、精度を上げることができる。この長いオリゴマーは、図6(a)、図6(b)、図6(c)、図6(d)に示す第

( $i=1, 2, \dots, N$ ) に、4つの流出口を持つ注入ノズル126を用いて、ターゲットDNAを含んだ反応溶液を加えて、ビーズに固定されたプライマーとハイブリダイズさせる。その後、dNTP混合溶液を加えて、各反応槽で相補鎖伸長反応が実行される。

【0106】相補鎖伸長反応の結果得られる化学発光は、回転テーブル121の下部に配置された光電子増倍管127、128、129、130を用いて、回転テーブル121を回転しながら、回転テーブル121上の周方向に保持される複数の反応槽について順次行なう。

【0107】(実施例5) 実施例5は、実施例2で説明した2つのオリゴマーを直列にターゲットにハイブリダイズさせて、相補鎖伸長反応を行なう例である。固体に固定された、実施例4で説明した4種のプライマーを用いる代わりに、2番目のオリゴマー(実施例2で説明した第2のプロープ)の種類を変化させてミューテーションを調べる方法である。

【0108】実施例5の方法では、1番目のオリゴマー(実施例2で説明した第1のプロープ)を、ビーズ等の固体担体の表面に固定するので、固体担体に固定するプライマーの種類を少なくすることができる利点がある。1番目のオリゴマー(プロープ)が固定された固体担体は、実施例4で説明した反応セル、反応槽に入れられる。

【0109】図11は、ターゲットDNAとしてp53遺伝子由来の1本鎖DNAであり、エクソン8の配列を含むDNA200を例にとった場合のプライマーの構成例を説明する図である。DNA200は配列番号10により示される標準的な158塩基長の塩基配列を持つ。もちろん、DNA200は配列番号10により示される標準的な158塩基長の塩基配列を含むDNA鎖であり、図示した配列に加えて、5' 末端側、及び/又は、3' 末端側に、p53遺伝子由来の塩基配列が連なっている場合でも、ミューテーション150、151、152、153、154の検出に関する以下の議論は成立する。

【0110】

1のプロープ61と同様に、相補鎖伸長能力がないように末端処理されている。

【0111】長いオリゴマー142、144、146、148と密着して、ターゲットDNAにハイブリダイズする6塩基長のオリゴマー141、143、145、147を用意する。6塩基長のオリゴマー(141、14

3、145、147)は、図6(b)、図6(c)、図6(d)に示す第2のアローブ62に相当する。6塩基長のオリゴマー(141、143、145、147)は、実施例2に於いて説明したように、単独でターゲットDNAにハイブリダイズして相補鎖合成する確率は低い、長いオリゴマー(142、144、146、148)と密着して隣接してハイブリダイズして相補鎖合成することが可能である。

【0112】しかし、長いオリゴマー(142、144、146、148)の3'末端がターゲットDNAとミスマッチを起こしていたり、6塩基長のオリゴマー(141、143、145、147)の3'末端、又は、6塩基長のオリゴマーの配列の何れかの塩基が、ターゲットDNAとミスマッチである場合、6塩基長のオリゴマーはターゲットDNAにハイブリダイズしない。もちろん5塩基長のオリゴマーを用いても良い。

【0113】ここでは、6塩基長のオリゴマーの3'末端が、ターゲットDNAのミューテーションを検査すべき位置となるようにプライマーを設計して検査を行う。ワイルドタイプとミュータントにそれぞれ相補な6塩基プライマーを用いて相補鎖合成することにより、単にミューテーションの存在の有無だけでなく、存在比を知ることができる。

【0114】そこで6塩基長のオリゴマーの3'末端が、ターゲットDNAのミューテーションを検査すべき位置となるようにプライマーを設計して検査を行なう。6塩基長のオリゴマーの種類を変化させて検査することにより、6塩基長のオリゴマーの3'末端の塩基種の違

$N_2$  AACAC

$N_2 = T$ の場合に信号が得られ、 $N_2 = A$ の時に信号がなければ、ミューテーション150が存在することが分かる。

【0120】相補鎖伸長能力がないアローブ144は、配列番号10の配列の5'末端から58番目から72番目の部分に相補結合し配列番号12の16塩基長の塩基

TCTGTN<sub>3</sub>N<sub>2</sub>GCC N<sub>1</sub>GTCTC

6塩基長のプライマー143は、配列番号10の配列の5'末端から52番目から57番目の部分に相補結合し配列番号12'の6塩基長の塩基配列を持つ。N<sub>4</sub>は、

TCCCAN<sub>4</sub>

相補鎖伸長能力がないアローブ146は、配列番号10の配列の5'末端から69番目から84番目の部分に相

GTTTCTCTTC CTCTGT

6塩基長のプライマー145は、配列番号10の配列の5'末端から63番目から68番目の部分に相補結合し配列番号13'の6塩基長の塩基配列を持つ。N<sub>1</sub>はG

N<sub>3</sub>N<sub>2</sub>GCCN<sub>1</sub>

それぞれの位置のミューテーションを調べるにはワイルドタイプも含めて4つのプライマーを用意する(両方のDNA鎖を調べるときは8つ)。ミューテーションが有

いによる相補鎖伸長反応の起こりやすさ等も調べることができる。

【0115】実際にp53のexon(エクソン)8では、図11の矢印で示す位置150、151、152、153、154のミューテーションを検出することができる。標準的な塩基Xが塩基Yに置換された場合をX→Yと表わすと(X、YはA、T、G、Cの何れかである)、図11で矢印で示す位置150、151、152、153、154に於けるミューテーションは、T→A、C→A、C→T、GC→AT、C→Tである。

【0116】図12は、図11に示すミューテーションを検出するための、相補鎖伸長能力がないアローブ、及び6塩基長のプライマーの構成を示す図である。

【0117】相補鎖伸長能力がないアローブ142は、配列番号10の配列の5'末端から43番目から58番目の部分に相補結合し配列番号11の16塩基長の塩基配列を持つ。もちろん、アローブ142は20塩基長から30塩基長のオリゴマーでも良い。N<sub>1</sub>は、ワイルドタイプおよびミュータントに対応した塩基種でGあるいはTのいずれかである。

【0118】CTCCCAN<sub>1</sub>GAC AGGCAC

:(配列番号11)6塩基長のプライ

マー141は、配列番号10の配列の5'末端から37番目から42番目の部分に相補結合し配列番号11'の6塩基長の塩基配列を持つ。N<sub>2</sub>は、A、Tの何れかである。

【0119】

:(配列番号11')

配列を持つ。この塩基長は安定なハイブリダイズに十分なものであれば良く、必要に応じて更に長いオリゴマーを使用しても良い。N<sub>1</sub>はGあるいはA、N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>はCGあるいはTAである。

【0121】

:(配列番号12)

T、Gの何れかである。

【0122】

:(配列番号12')

補結合し配列番号13の16塩基長の塩基配列を持つ。

【0123】

:(配列番号13)

あるいはAであり、N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>はCGあるいはTAである。

【0124】

:(配列番号13')

るか否かを調べるだけならワイルドタイプに対応するプライマーは混合物にして用いればよい。もちろん、ターゲットDNAに相補結合するプライマーの位置をずらし

て、1又は複数のミューテーションを順次検出できるようにしても良い。

【0125】相補鎖伸長能力がないプローブ148は、配列番号10の配列の5'末端から141番目から15

CTTGTCCTGC TTCGTT

6塩基長のプライマー147は、配列番号10の配列の5'末端から135番目から140番目の部分に相補結合し配列番号14'の6塩基長の塩基配列を持つ。N

ACCTCN

N=Aの場合に、ミューテーション154の存在を検知できる。

【0128】なお、実施例4で説明したDNA変異検出装置を、上記で説明した各実施例でのミューテーションの検出に使用できることは言うまでもない。

【0129】以上説明したように本発明によれば、4種類のdNTPを同時に反応部に加えて相補鎖伸長反応を行なうことにより、一度に生成するピロリン酸の分子数を増やし、また、ピロリン酸の生成プロセスを繰り返すことにより、従来のパイロシーケンス法に比較して、数桁高い発光強度を得ることができる。

【0130】従って、PCR等の増幅プロセスを行わずにターゲットDNAの有無、及びミューテーションの有無を調べることができる。また、ターゲットDNA中にワイルドタイプとミュータントが一定の比率で存在するときには、それぞれに対応するプライマーをそれぞれ異なる固体担体の表面上に固定して用いることにより、種々の塩基置換を調べることができる。特に、長いDNAに含まれる複数部分の置換を知ることができる。本発明の方法は、ターゲットDNAをビーズに固定したり、区画された固体表面に固定したりして、多くのDNA試料を同時に解析する高スループット装置に応用可能である。

【0131】以下に、本発明の変異検出方法の特徴を列記する。

【0132】本発明の変異検出方法では、検出しようとする特定のDNA配列、又は特定のRNA配列の領域に相補的な配列を含むプライマーを、DNA試料、又はRNA試料にハイブリダイズさせて、核酸基質(dATP、dTTP、dGTP、及びdCTP、あるいは、これらの類似体)と、DNA試料の場合にはDNAポリメラーゼ、RNA試料の場合には逆転写酵素を用いた相補鎖伸長反応が進行するか否かを、相補鎖伸長反応の反応副産物として生じるピロリン酸をATPに変換し、ルシフェラーゼ等の酵素を用いて発光反応を行ない発光を検出することにより特定配列の有無を検出する。

【0133】RNA試料に直接ハイブリダイズするプライマー、4種の核酸基質、逆転写酵素を用いた相補鎖伸長反応では、cDNAが形成され、この時、遊離するピロリン酸を検出することにより、RNAの変異を検出することができる。

6番目の部分に相補結合し配列番号14の16塩基長の塩基配列を持つ。

【0126】

: (配列番号14)

は、GあるいはAのいずれかである。

【0127】

: (配列番号14')

【0134】上記方法に於いて、特定の配列にハイブリダイズするプライマーに加えて、複数種の核酸基質を同時に加えて相補鎖伸長反応を繰り返すことにより生成するピロリン酸をATPに変換して発光反応を起こさせて発光を検出する。また、特定の配列にハイブリダイズするプライマーに加えて、4種の核酸基質を同時に加えて相補鎖伸長反応により生成するピロリン酸をATPに変換して発光反応を起こさせて発光を検出する。

【0135】また、上記方法に於いて、プライマーの3'末端の近傍に人為的に、ターゲットDNA、又はターゲットRNAと相補的でないヌクレオチドを入れて、相補鎖伸長反応が起きたか否かを、ピロリン酸をATPに変換して、ルシフェラーゼ等によりルシフェリン等の発光基質と反応せしめ化学発光をおこして光を検出することにより1塩基置換(SNPs)を検出する。

【0136】また、上記方法において、ワイルドタイプおよびミュータントにハイブリダイズして相補鎖合成を起こし得る少なくとも2種のプライマーを用いて、それぞれ独立に相補鎖合成と化学発光の検出を行い、これらの情報から正確にミュータントの存在の有無、および存在比を決定する。さらに、2本鎖DNAのそれぞれについて、上記2種のプライマーを準備して(合計4種)相補鎖合成と発光検出を行い、正確にミュータントの存在比を決定する。これは測定サンプルが種々ノゲノムDNAの混合物であり、病気とSNPsの関連を統計的に調べる上で有効である。

【0137】また、上記方法に於いて、相補鎖伸長反応による伸长相補鎖を末端から酵素で分解し、繰り返しプライマーをターゲットDNA、ターゲットRNAにハイブリダイズさせて相補鎖伸長反応を繰り返して行ない、一連の繰り返しの相補鎖伸長反応で多量のPPiを生成してATPに変換し、ルシフェリンと反応させて光を得てこれを検出する。伸长相補鎖を分解する酵素として、5'末端からDNA鎖、又はRNA鎖を分解する酵素を使用する。

【0138】また、上記方法に於いて、ターゲットとなるDNA鎖、RNA鎖に相補であり、目的とする2塩基置換部位又はその近傍に3'末端が結合するプライマーを用いて相補鎖伸長反応を行ない、相補鎖伸長反応で生じるピロリン酸をATP等に変換してルシフェリン等の発光基質と反応させ化学発光を起こし光学的に1塩基置

換 (SNPs) を検出する。

【0139】本発明の試薬キットは、ターゲットとなるDNA鎖、又はRNA鎖に相補であり目的とする1塩基置換部位又はその近傍に3'末端が結合するプライマーと、核酸基質 (dATP、dTTP、dGTP、及びdCTP、あるいは、これらの類似体) を少なくとも含み1塩基置換 (SNPs) を少なくとも含み、1塩基置換 (SNPs) を検出したり、その存在比を調べるための試薬キットである。

【0140】また、本発明の試薬キットは、ターゲットとなるDNA鎖、又はRNA鎖に相補であり目的とする1塩基置換部位又はその近傍に3'末端が結合するプライマーと、核酸基質 (dATP、dTTP、dGTP、及びdCTP、あるいは、これらの類似体) と、不純物として含まれるピロリン酸を分解する酵素を少なくとも含み、1塩基置換 (SNPs) を検出したり、その存在比を調べるための試薬キットである。

【0141】本発明の1塩基置換の検出法では、末端ヌクレオチドの種類がそれぞれ異なるプライマーを、プライマーの種類毎にそれぞれ固体表面の異なる区画に、あるいは、プライマーの種類毎にそれぞれ異なる反応槽に保持し、各区画に、あるいは、各反応槽の反応液に、複数種類のdNTPの混合物を加えることにより、プライマーを始点とする相補鎖伸長反応が起こり得る状態として、実際に相補鎖伸長反応がどの種類のプライマーで起こったかを、ターゲットDNA、又はターゲットRNAにハイブリダイズしたプライマーを始点とする相補鎖伸長反応で生成するピロリン酸をATPに変換して、ルシフェリン等と反応させることにより生じる化学発光を検出することにより、相補鎖伸長反応が起こったプライマーの種類を識別して、ターゲットDNA、又はターゲットRNA中の変異を検出する。

【0142】また、本発明の1塩基置換の検出法では、ターゲットDNA、又はターゲットRNAにハイブリダイズし、相補鎖伸長能力のない、互いに異なる配列を持つ複数種類の長いオリゴマーを、長いオリゴマーの種類毎にそれぞれ固体表面の区画に、あるいは、長いオリゴマーの種類毎にそれぞれ異なる反応槽に保持し、各区画に、あるいは、各反応槽に、相補鎖伸長能力のある5塩基長から8塩基長の範囲の短いオリゴマーを添加して、短いオリゴマーを長いオリゴマーと直列にターゲットDNA、又はターゲットRNAにハイブリダイズさせて、複数種類のdNTPの混合物を更に加えることにより、短いプライマーを始点とする相補鎖伸長反応で生成するピロリン酸をATPに変換して、ルシフェリン等と反応させることにより生じる化学発光を検出することにより、相補鎖伸長反応が起こったプライマーの種類を識別して、ターゲットDNA、又はターゲットRNA中の変異を検出する。この場合用いる化学発光試薬はルシフェリンに限定されるものではない。

【0143】本発明の変異検出装置は、末端ヌクレオチドの種類がそれぞれ異なるプライマーを、プライマーの種類毎にそれぞれ固体表面の異なる区画に保持する複数の区画を具備する反応チップ、あるいは、プライマーの種類毎にそれぞれ異なる反応槽に保持する複数の反応槽が配置される反応槽支持基板と、各区画に、あるいは、各反応槽の反応液に、複数種類のdNTPの混合物を加えることにより、プライマーを始点とする相補鎖伸長反応が起こり得る状態として、実際に相補鎖伸長反応がどの種類のプライマーで起こったかを、ターゲットDNA、又はターゲットRNAにハイブリダイズしたプライマーを始点とする相補鎖伸長反応で生成するピロリン酸をATPに変換して、ルシフェリン等と反応させることにより生じる化学発光を検出する光検出器とを有し、相補鎖伸長反応が起こったプライマーの種類を識別して、ターゲットDNA、又はターゲットRNAに含まれる変異を検出する。

【0144】また、本発明のDNA又はRNAの変異検出装置は、ターゲットDNA、又はターゲットRNAにハイブリダイズし、相補鎖伸長能力のない、互いに異なる配列を持つ複数種類の長いオリゴマーを、長いオリゴマーの種類毎にそれぞれ固体表面の区画に保持する複数の区画を具備する反応チップ、あるいは、長いオリゴマーの種類毎にそれぞれ異なる反応槽に保持する複数の反応槽が配置される反応槽支持基板と、各区画に、あるいは、各反応槽に、相補鎖伸長能力のある5塩基長から8塩基長の範囲の短いオリゴマーを添加して、短いオリゴマーを前記長いオリゴマーと直列にターゲットDNA、又はターゲットRNAにハイブリダイズさせて、複数種類のdNTPの混合物を更に加えることにより、短いプライマーを始点とする相補鎖伸長反応で生成するピロリン酸をATPに変換して、ルシフェリン等と反応させることにより生じる化学発光を検出する光検出器とを有し、相補鎖伸長反応が起こった短いプライマーの種類を識別して、ターゲットDNA、又はターゲットRNAに含まれる変異を検出する。

【0145】更に、本発明の変異検出方法は、ターゲットDNA、又はターゲットRNAの特定の配列の領域に相補的な配列を含むプライマーをハイブリダイズさせる工程と、4種類の核酸基質とポリメラーゼ又は逆転写酵素とを用いて、プライマーを始点とする相補鎖伸長反応を行なう工程と、相補鎖伸長反応の反応副産物として生じるピロリン酸をATPに変換し、ルシフェラーゼ等の酵素を用いて発光反応を行ない発光を検出する工程とを有し、特定の配列の有無を検出する。

【0146】更に、本発明の変異検出方法は、ターゲットDNA、又はターゲットRNAの特定の配列の領域に相補的な配列を含み、3'末端から2塩基目、又は、3塩基目の塩基の種類がターゲットDNA、又はターゲットRNAの配列と相補的でない配列を持つプライマーを



ハイブリダイズさせる工程と、4種類の核酸基質とポリメラーゼ又は逆転写酵素とを用いて、プライマーを始点とする相補鎖伸長反応を行なう工程と、相補鎖伸長反応の反応副産物として生じるピロリン酸をATPに変換し、酵素を用いて発光反応を行ない発光を検出する工程とを有し、特定の配列の有無を検出する。

【0147】更に、本発明の変異検出方法は、相補鎖伸長能力のある5塩基長から8塩基長の範囲の短いオリゴマーと、ターゲットDNA、又はターゲットRNAにハイブリダイズし相補鎖伸長能力のない長いオリゴマーとを直列にターゲットDNA、又はターゲットRNAにハイブリダイズさせる工程と、4種類の核酸基質とポリメラーゼ又は逆転写酵素とを用いて、短いプライマーを始点とする相補鎖伸長反応を行なう工程と、相補鎖伸長反応の反応副産物として生じるピロリン酸をATPに変換し、酵素を用いて発光反応を行ない発光を検出する工程とを有し、特定の配列の有無を検出する。

【0148】本発明の検出方法はターゲットとなるワイルドタイプおよびミュータントに対応した2つのプローブ(プライマー)を使用し、精度を上げるもので、相補鎖合成により生成したピロリン酸の検出に限定されるものではない。生成物のDNA鎖をそれぞれ異なる標識蛍光体で標識し、電気泳動などで比較分析しても良い。さらに、他のSNPs検出方法似も応用可能である。すなわち、ワイルドタイプに作用して信号を与えるプローブとミュータントに作用して信号を与えるプローブの両方を活用して精度良くミュータントの存在比を求める。

【0149】

【発明の効果】以上説明したように本発明によれば、

#### SEQUENCE LISTING

<110> HITACHI, LTD.

<120> Mutation Detection Method of DNA and Apparatus for Mutation Detection

<130> H00011571A

<160> 18

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer used for forming an extended complementary strand

<400> 1

agttttaaga gggttgtgtg 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

(1) DNAに含まれるミューテーションの有無を特別に設計されたプライマーを用いること、(2)プライマーが相補鎖伸長反応により伸长相補鎖を形成するか否かで判断できる様にすること、(3)伸长相補鎖の検出を、相補鎖伸長反応により放出されるピロリン酸の数を、公知のピロシーケンシングに比べて2桁以上とできることにより、ミューテーションを、簡単に容易に高感度で検出できる。また、複数のプローブあるいはプライマーを用いることにより、ワイルドタイプおよびミュータントを含む複数の試料について、精度高く変異種の存在比を調べることができる。

【0150】また、本発明によれば、複数種のDNA変異株が含まれるDNA試料の分析が可能であり、予想される塩基配列を考慮して、プライマーを複数種類準備して、ミューテーションを調べることにより、DNA変異計測に要求される種々の項目(予想された塩基配列だけが存在するのか、変異が含まれているのか、変異はどのような種類で何処に現れるのか、変異が何カ所に現れるのか等)を簡便に知ることができる。

【0151】本発明では、ゲル電気泳動を使わず、高感度で励起光源を必要とせず、反応は単純で時間も短く簡便な、DNA変異検出方法、及び装置、更に、複数の変異を含んだ試料を信頼度高く分析できるDNA変異検出方法、及び装置を提供することができる。従って、DNA変異計測に要求される種々の項目を容易に知ることができる。

【0152】

【配列表】

<;223>; DNA primer used for forming an extended complementary strand  
<;400>; 2

agttttaaga gggttggtgc 20

<;210>; 3

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; DNA primer used for forming an extended complementary strand

<;400>; 3

agttttaaga gggttggtgg 20

<;210>; 4

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; DNA primer used for forming an extended complementary strand

<;400>; 4

agttttaaga gggttggtga 20

<;210>; 5

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; DNA primer having base sequence replaced T at 18 of SEQ ID NO: 1 b  
y A for introducing a mismatch between DNA primer and template DNA

<;400>; 5

agttttaaga gggttgtagt 20

<;210>; 6

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; DNA primer having base sequence replaced T at 18 of SEQ ID NO: 2 b  
y A for introducing a mismatch between DNA primer and template DNA

<;400>; 6

agttttaaga gggttgtagc 20

<;210>; 7

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; DNA primer having base sequence replaced T at 18 of SEQ ID NO: 3 b  
y A for introducing a mismatch between DNA primer and template DNA

<;400>; 7

agttttaaga gggttgtagg 20

<;210>; 8  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; DNA primer having base sequence replaced T at 18 of SEQ ID No: 4 by A for introducing a mismatch between DNA primer and template DNA  
<;400>; 8  
agttttaaga gggttgtaga 20  
<;210>; 9  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;

<;223>; Template DNA  
<;400>; 9  
tcaaaattct cccaacaaca 20  
<;210>; 10  
<;211>; 158  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Template DNA originating from p53 and including base sequence of exon 8  
<;400>; 10  
tggtaatcta ctgggacgga aacagctttg aggtgcgtgt ttgtccctgt cctgggagag 60  
accggcgcac agaggaagag aatctccgca agaaagggga gcctcaccac gagctgaaaa 120  
cagggagcac taagcgaggt aagcaagcag gacaagaa  
158  
<;210>; 11  
<;211>; 16  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;221>; unsure  
<;222>; (7)  
<;223>; DNA probe complementary with base sequence between 43 and 58 of SEQ ID NO: 10 (n is a or c or g or t) and DNA probe being not able to be extended  
<;400>; 11  
ctcccangac aggcac 16  
<;210>; 12  
<;211>; 16

<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;

<;221>; unsure  
 <;222>; (6)-(7), (11)  
 <;223>; DNA probe complementary with base sequence between 58 and 72 of SE  
 Q ID NO: 10 ( $n_1$  is g or a,  $n_2n_3$  is cg or ta) and DNA probe being not able to be extended  
 <;400>; 12  
 tctgt $n_3n_2$ gcc  $n_1$ gtctc 16  
 <;210>; 13  
 <;211>; 16  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; DNA probe complementary with base sequence between 69 and 84 of SE  
 Q ID NO: 10 and DNA probe being not able to be extended  
 <;400>; 13  
 gtttctcttc ctctgt 16  
 <;210>; 14  
 <;211>; 16  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; DNA probe complementary with base sequence between 141 and 156 of  
 SEQ ID NO: 10 and DNA probe being not able to be extended  
 <;400>; 14  
 cttgtctctgc ttcgtt 16

## 配列表フリーテキスト

(1) 配列番号1の配列に関する他の関連する情報の記載

伸長相補鎖を形成するためのDNAプライマー。

【0153】(2) 配列番号2の配列に関する他の関連する情報の記載

伸長相補鎖を形成するためのDNAプライマー。

【0154】(3) 配列番号3の配列に関する他の関連する情報の記載

伸長相補鎖を形成するためのDNAプライマー。

【0155】(4) 配列番号4の配列に関する他の関連する情報の記載

伸長相補鎖を形成するためのDNAプライマー。

【0156】(5) 配列番号5の配列に関する他の関連する情報の記載

配列番号1の配列の5'末端から18番目の塩基Tを塩基Aに置き換えミスマッチを導入したDNAプライマー。

【0157】(6) 配列番号6の配列に関する他の関連する情報の記載

配列番号2の配列の5'末端から18番目の塩基Tを塩基Aに置き換えミスマッチを導入したDNAプライマー。

【0158】(7) 配列番号7の配列に関する他の関連する情報の記載

配列番号3の配列の5'末端から18番目の塩基Tを塩基Aに置き換えミスマッチを導入したDNAプライマー。

【0159】(8) 配列番号8の配列に関する他の関連する情報の記載

配列番号4の配列の5'末端から18番目の塩基Tを塩基Aに置き換えミスマッチを導入したDNAプライマー。

【0160】(9) 配列番号9の配列に関する他の関連する情報の記載

ターゲットDNA。

【0161】(10) 配列番号10の配列に関する他の関連する情報の記載

p53遺伝子由来の1本鎖DNAでありエクソン8の配列を含むターゲットDNA。

【0162】(11) 配列番号11の配列に関する他の関連する情報の記載

配列番号10の配列の5'末端から43番目から58番目の部分に相補結合し、6塩基長の塩基配列を持つ相補鎖伸長能力がないDNAプローブ( $n$ は、a、c、g、tの何れか)。

【0163】(12) 配列番号12の配列に関する他の関連する情報の記載

配列番号10の配列の5'末端から58番目から72番目の部分に相補結合し、16塩基長の塩基配列を持つ相

補鎖伸長能力がないDNAプローブ ( $n_1$ はgあるいはa、 $n_2 n_3$ はcgあるいはta)。

【0164】(13) 配列番号13の配列に関する他の関連する情報の記載

配列番号10の配列の5'末端から69番目から84番目の部分に相補結合し、16塩基長の塩基配列を持つ相補鎖伸長能力がないDNAプローブ。

【0165】(14) 配列番号14の配列に関する他の関連する情報の記載

配列番号10の配列の5'末端から141番目から156番目の部分に相補結合し、16塩基長の塩基配列を持つ相補鎖伸長能力がないDNAプローブ。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1を説明する図。

【図2】実施例1で使用したプライマーの構成例と、それぞれのプライマーによる伸長相補鎖の形成に応じた発光強度を説明する図。

【図3】ミューテーションがあるターゲットDNAの検出例を示す図であり、プライマーに応じた相補鎖伸長反応に伴って反応副産物として生成するピロリン酸の有無を示すルシフェラーゼによる相対発光強度を示す図。

【図4】本発明の実施例に於ける化学反応の概要を説明する図。

【図5】公知のピロケージングによる相補鎖伸長反応の発光強度と、実施例1による相補鎖伸長反応の発光強度とを比較した図。

【図6】本発明の実施例2を説明する図。

【図7】本発明の実施例3を説明する図。

【図8】本発明の実施例4のDNA変異検出装置の構成例を示す鳥瞰図。

【図9】本発明の実施例4のDNA変異検出装置の構成例を示す断面図。

【図10】本発明の実施例4のDNA変異検出装置の他の構成例を説明する図。

【図11】本発明の実施例5を説明する図。

【図12】図11に示すミューテーションを検出するための、相補鎖伸長能力がないプローブ、及び6塩基長のプライマーの構成を示す図。

【符号の説明】

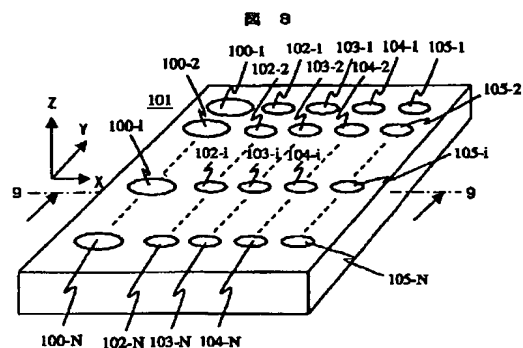
1、2、45、63、85…ターゲットDNA、3、35…ターゲットDNAのミューテーションの有無を調べる位置、5、46、86…プライマー、6…プライマーの3'末端の塩基、7、8、48、66、67、70、82…伸長相補鎖、37、38、39、40、41、42、43、44…相対発光強度を示す曲線、47…相補鎖合成の基質、49、49'、68、88…ピロリン酸、50…ATP、51…発光、61…第1のプローブ、62…第2のプローブ、64…ダイデオキシヌクレオチド、65…第2のプローブがハイブリダイズすべきターゲットDNAの部位、69…ミューテーション、81…固体担体、83…伸長相補鎖により形成された相補鎖、84…ヌクレオチド、101…反応チップ、102-i、103-i、104-i、105-i ( $i=1, 2, \dots, N$ )…反応セル、106-i、107-i、108-i、109-i ( $i=1, 2, \dots, N$ )…ビーズ、111…レンズ、112…光検出器、113…検出器支持台、141、143、145、147…6塩基長のオリゴマー、142、144、146、148…長いオリゴマー、150、151、152、153、154…ミューテーション、121…円形の回転テーブル、122-i、123-i、124-i、125-i ( $i=1, 2, \dots, N$ )…反応槽、126…注入ノズル、127、128、129、130…光電子増倍管、200…p53遺伝子由来のエクソン8の配列を含むDNA。

【図2】

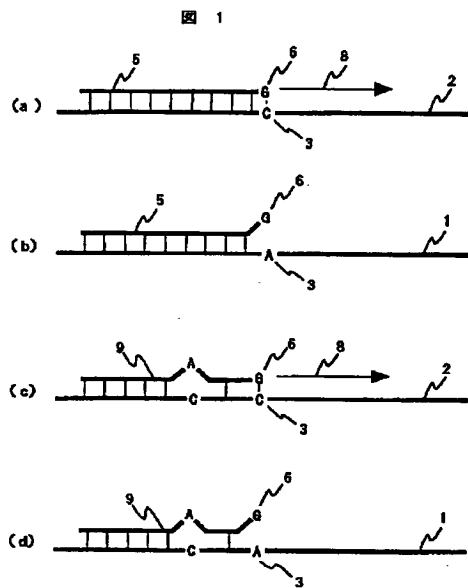
図2

プライマー名	配列番号	配列	相対発光強度
SNP1-1	1	AGTTTAAAGAGGGTTGTTGT	100
SNP1-2	2	AGTTTAAAGAGGGTTGTTGC	65
SNP1-3	3	AGTTTAAAGAGGGTTGTTGG	61
SNP1-4	4	AGTTTAAAGAGGGTTGTTGA	6
SNP2-1	5	AGTTTAAAGAGGGTTGTAGT	97
SNP2-2	6	AGTTTAAAGAGGGTTGTAGC	3
SNP2-3	7	AGTTTAAAGAGGGTTGTAGG	5
SNP2-4	8	AGTTTAAAGAGGGTTGTAGA	4

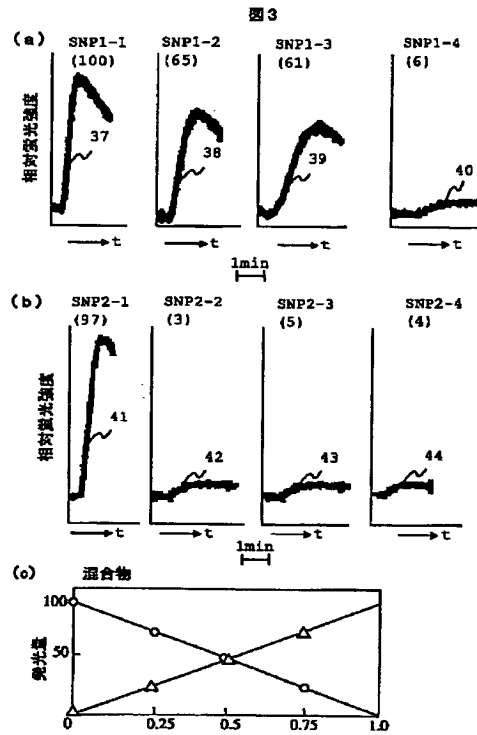
【図8】



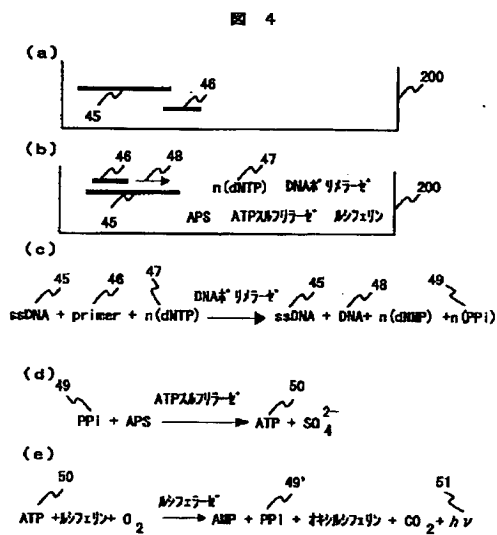
【図1】



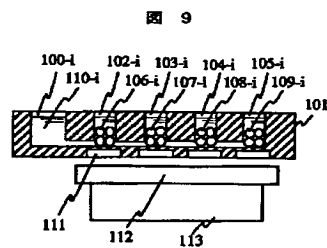
【図3】



【図4】

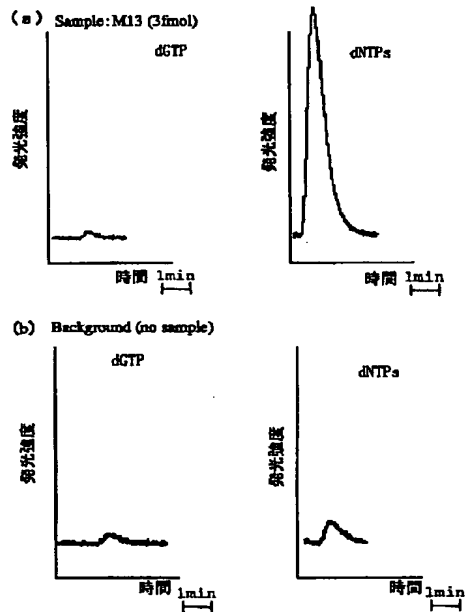


【図9】



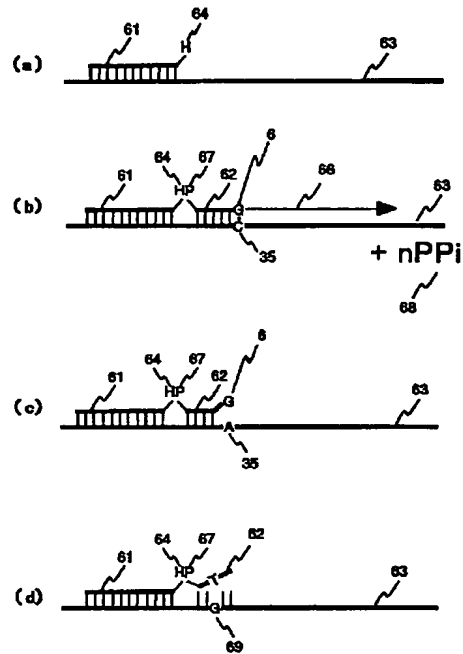
【図5】

図 5



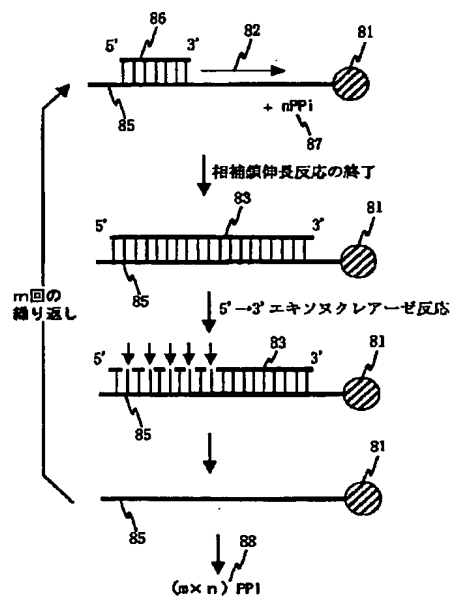
【図6】

図 6



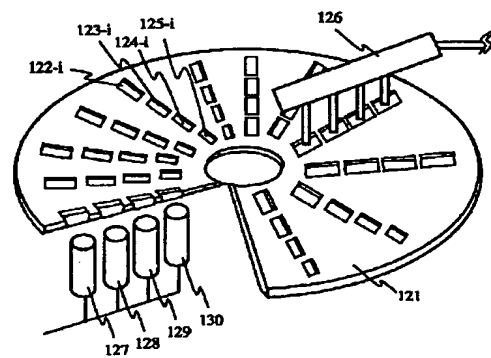
【図7】

図 7

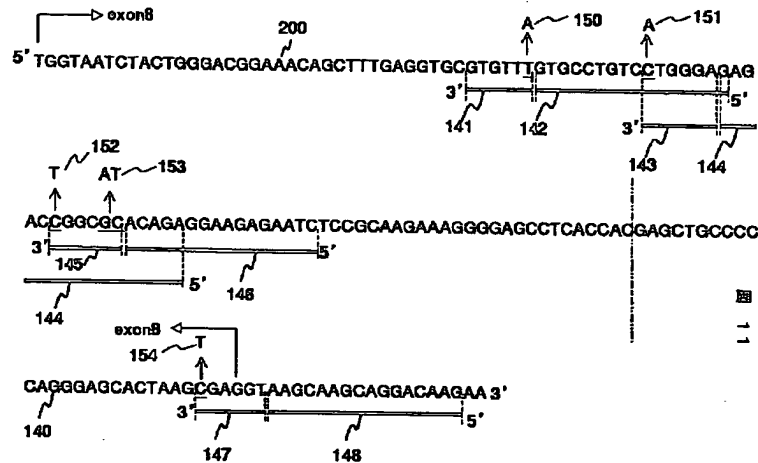


【図10】

図 10



【図11】



【図12】

図 12

配列番号	6塩基長のプライマー
11'	N <sub>1</sub> A A C A C
12'	T C C C A N <sub>2</sub>
13'	N <sub>3</sub> N <sub>4</sub> G C C N <sub>1</sub>
14'	A C C T C N
配列番号	相対的な塩基配列が不明なプローブ
11	C T C C C A N <sub>1</sub> G A C A G G C A C
12	T C T G T N <sub>2</sub> G C C N <sub>3</sub> G T C T C
13	G T T T C T C T T C C T C T G T
14	C T T G T C C T G C T T C G T T

N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, N<sub>4</sub> は、A, T, G, Cの何れかである。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/566

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00

ターム(参考)

Z N A A

(72)発明者 岡野 和宣

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地  
株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 釜堀 政男

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地  
株式会社日立製作所中央研究所内

Fターム(参考) 2G054 CA22 EA01

4B024 AA11 BA80 CA01 CA09

4B029 AA07 BB20 CC03 FA12

4B063 QA01 QA17 QQ42 QR08 QR32

QR55 QR58 QR62 QS25 QS34

QS36 QX02